

# LeucoScreen Plus



Kit histochimique semi-quantitatif pour la détermination des leucocytes positifs à la peroxydase dans le sperme humain

Réf. doc: FP09 I111 R01 A.4 Mise à jour: 1/02/2021

Usage diagnostic in vitro (DIV) - Réactif réservé à un usage professionnel

## INTRODUCTION

La plupart des éjaculats humains contiennent des leucocytes, dont la forme prédominante sont des granulocytes positifs à la peroxydase<sup>1,2,3,4</sup>. Une présence excessive de ces cellules (leucocytospermie) peut indiquer une infection de l'appareil reproducteur. La leucocytospermie peut aussi être associée à d'autres anomalies du sperme (réduction de la motilité des spermatozoïdes et de l'intégrité de l'ADN, augmentation de la viscosité du sperme et réduction de la fonction des spermatozoïdes en raison du stress oxydatif et/ou sécrétion de cytokines cytotoxiques par ces globules blancs). Bien que la leucocytospermie ne soit pas une indication absolue d'infertilité, cette affection est observée en moyenne chez 10 à 20% de tous les hommes infertiles<sup>5</sup>.

Lorsqu'une analyse cytologique du sperme est effectuée, il est très difficile de différencier les globules blancs d'autres types de cellules rondes (par exemple certaines de la lignée germinale<sup>6</sup>). Il est alors nécessaire d'utiliser une technique de coloration spécifique des leucocytes, rapide et peu coûteuse en utilisant leur pouvoir peroxydasique<sup>7</sup>. LeucoScreen Plus est, tout comme LeucoScreen, basé sur cette technique et peut donc être utilisé pour colorer les globules blancs positifs à la peroxydase dans un échantillon de sperme humain.

Selon l'Organisation mondiale de la santé, la présence de plus d'un million de globules blancs positifs à la peroxydase (WBC) par ml d'éjaculat est considérée comme anormale et est étiquetée comme "leucocytospermie"<sup>4</sup>. Cependant, ce seuil fait l'objet d'un débat, certains ayant trouvé cette valeur trop faible et d'autres trop élevées. En effet, des seuils de  $0,2 \times 10^6$  -  $2 \times 10^6$  ont été rapportés dans la littérature<sup>8-10</sup>.

Lorsque le seuil d'un million de globules blancs positifs à la peroxydase par ml d'éjaculat est dépassé, des tests microbiologiques doivent être effectués pour déterminer s'il y a une infection des glandes annexes. L'évaluation des marqueurs des glandes annexes peut fournir des informations supplémentaires utiles sur le bon fonctionnement de l'épididyme (EpiScreen Plus, FertiPro nv), des vésicules séminales (Fructose Test, FertiPro nv) ou de la prostate. Fait important, l'absence de leucocytes n'exclut pas toujours la possibilité d'une infection des glandes annexes.

Le nombre de tests pouvant être effectués avec le kit LeucoScreen Plus n'est pas spécifié, en revanche le kit a été conçu pour 40 jours d'analyse pendant la durée de service du kit (20 solutions de travail peuvent être réalisées, ces dernières seront stables pendant 2 jours consécutifs).

## MATERIEL FOURNI AVEC LE TEST

- Réactif 1 – 6 ml de Solution de substrat (contient: 4-CN, méthanol)
- Réactif 2 – 300 µl de peroxyde d'hydrogène à 30%
- Réactif 3 – 22 ml de solution tampon
- Réactif 4 – 1.2 ml de Contre-colorant

Un certificat d'analyse et la FDS peuvent être téléchargés sur notre site internet ([www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)).

## MATERIEL NON FOURNI AVEC LE TEST

Lames de microscope, lamelles couvre-objet, tubes d'Eppendorf, pipettes, microscope optique

**Remarque:** il est conseillé d'utiliser un microscope optique et pas un microscope à contraste de phase car ce dernier pourrait entraîner des difficultés d'interprétation.

## TYPE D'ÉCHANTILLON

Le test doit être exécuté sur des échantillons de sperme humain natifs contenant plus de  $1 \times 10^6$  de cellules rondes par ml. Il doit être exécuté le jour du recueil du sperme.

## PRINCIPE DU TEST

La myéloperoxydase, présente dans les granules de certains leucocytes, oxyde le 4-CN en 4-chloro-1-naphthol violet bleuté, en utilisant  $H_2O_2$  comme oxydant. Le Réactif 4 est une solution de contre-coloration pour faciliter la différenciation entre les cellules rondes positives à la peroxydase et les cellules rondes négatives à la peroxydase.

## INTERPRÉTATION

- **Les cellules rondes positives à la peroxydase:** contiennent des granules noirs (bleutés) et ont un cytoplasme gris anthracite. Cette zone anthracite peut couvrir la totalité de la cellule ou seulement une partie de celle-ci.
- **Les cellules rondes négatives à la peroxydase:** restent non colorés ou peuvent être colorés en rose. Les granules observés dans les cellules non colorées ne sont pas entourés de la couleur anthracite typique observée dans les cellules positives.

## PERFORMANCE

Dans une étude de validation indépendante, 44 échantillons ont été analysés par différents opérateurs avec LeucoScreen et LeucoScreen Plus. Caractéristiques de performance:

- **Exactitude:** Les deux kits ont fourni des résultats comparables basés sur l'analyse Passing Bablok.
- **Précision:** Les deux kits peuvent distinguer les cellules rondes positives et négatives à la peroxydase avec une précision comparable (LeucoScreen Plus:  $CV_{intra}$ : 12%;  $CV_{inter}$ : 10%)

## VÉRIFICATION AVANT UTILISATION

Le réactif 1 doit contenir un liquide clair, ne pas utiliser le kit si le liquide est devenu jaune.

## MÉTHODE

Avant la première utilisation du kit LeucoScreen Plus, nous vous recommandons vivement de suivre le programme d'entraînement et de regarder notre vidéo de démonstration, qui sont tous deux disponibles sur notre site Internet. Ou scannez le code-barres pour voir le vidéo:



1. Comptez les cellules rondes en même temps que vous déterminez la concentration de spermatozoïdes lors d'une analyse de routine. Calculez et notez la concentration totale de cellules rondes en millions/ml, car cette concentration est nécessaire pour le calcul de la concentration de globules blancs positives à la peroxydase. Quand la concentration de cellules rondes dépasse  $1 \times 10^6$  par ml, le test LeucoScreen Plus est indiqué.
2. Préparation de la solution de travail: ajoutez les volumes suivants dans un tube Eppendorf et mélangez soigneusement.
  - 200 µl de Réactif 1
  - 5 µl de Réactif 2
  - 1 ml de Réactif 3.Cette solution de travail reste stable pendant 48 heures si stocké entre 2-8°C, à l'abri de la lumière (du soleil).
3. Prenez 10 µl de l'échantillon de sperme et ajoutez 20 µl de la solution de travail. Mélangez à fond.
4. Incubez deux minutes à température ambiante **dans l'obscurité**.
5. Transférez 10 µl du mélange au milieu d'une lame de microscope et ajoutez 10 µl de Réactif 4. Mélangez à fond en utilisant le bord de la lamelle couvre-objet.
6. Couvrez avec la lamelle couvre-objet.
7. Comptez et classez un total de 200 cellules rondes en utilisant un grossissement x400. Explorez différents champs microscopiques (de préférence 20).

**Remarque:** Pour certains échantillons de sperme, vous pourriez préférer concentrer la préparation pour faciliter le comptage cellulaire. Dans ce cas, centrifuger l'échantillon pendant 15 minutes à 350 G, enlever le volume de l'échantillon de sperme et remettre en suspension le culot.

En cas de concentration très élevée de cellules rondes (au-delà de  $20 \times 10^6$  par ml), il est fortement conseillé de diluer l'échantillon dans du PBS ou dans du FertiCult™ Flushing medium.

## CALCUL DE LA CONCENTRATION DES LEUCOCYTES POSITIFS À LA PEROXYDASE

- Calculez la proportion de cellules positives à la peroxydase comme suit :

$$\text{PROPORTION DE CELLULES RONDES POSITIVES} = \frac{\text{Nombre de cellules rondes POSITIVES}}{\text{(Nombre de cellules rondes POSITIVES + Nombre de cellules rondes NÉGATIVES)}}$$

- Calculez ensuite la concentration de leucocytes positifs à la peroxydase dans l'échantillon de sperme comme suit :

$$\text{CONCENTRATION (millions/ml)} = \text{Proportion de cellules rondes positives} \times \text{concentration totale de cellules rondes}$$

Exemple :

- La concentration totale de cellules rondes est de 2 millions/ml (déterminée lors de l'analyse de la concentration des spermatozoïdes)
- Le test LeucoScreen Plus indique que 120 cellules rondes sont positives et 80 négatives
- Proportion de cellules rondes positives =  $\frac{120}{(120 + 80)} = 0,6$
- Concentration de leucocytes positifs à la peroxydase =  $0,6 \times 2 \text{ millions/ml} = 1,2 \text{ million/ml}$

## CONSERVATION ET LA STABILITÉ

Conservez les réactifs entre 2°C-25°C. Le produit reste stable après transport ou stockage à court terme aux températures élevées (jusqu'à 5 jours à  $\leq 37^\circ\text{C}$ ). Ne pas congeler. Protégez de la lumière (du soleil). Le kit est stable pendant au moins de 12 mois après la date de production (même si les bouteilles ont été ouvertes), ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur l'étiquette du produit. Les bouteilles doivent rester hermétiquement fermées en tout temps. La solution de travail peut être conservée jusqu'à 48 heures à 2-8°C, protégée de la lumière (du soleil).

## LIMITES DE LA MÉTHODE

Ce test est une aide au diagnostic de l'infertilité masculine et, comme pour les autres tests biologiques, les résultats doivent être interprétés à la lumière des observations cliniques et des données de l'anamnèse. Le test LeucoScreen Plus ne colore que les globules blancs positifs à la peroxydase; les autres types de globules blancs (lymphocytes et monocytes, p. ex.) ne peuvent pas être détectés de cette manière.

## MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

L'utilisation de gants est conseillée. Réactif 1 contient du méthanol: évitez la respiration des vapeurs. Réactif 2 contient de l' $H_2O_2$ : corrosif, provoque des brûlures. Après tout contact avec la peau, lavez immédiatement avec de l'eau et du savon. Portez une protection oculaire/des protections visage. Tous les échantillons de sperme doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Manipulez tous les échantillons comme s'ils étaient capables de transmettre le VIH ou l'hépatite. Utilisez toujours des pointes de pipette neuve pour chaque étape afin d'éviter la contamination croisée. Ne jetez pas le produit dans l'environnement.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Wolff, H., Anderson, D.J. (1988) Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 49(3): 497-504
2. Aitken, R.J., West, K.M. (1990) Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13 (6):433-51.
3. Barratt, C.L.R., Bolton, A.E., Cooke, I.D. (1990) Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*, 5(6):639-44.
4. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition (2010), p. 102-107.
5. Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41(1):183-7.
6. Hill, J.A., Haimovici, F., Politch, J.A., Anderson, D.J. (1987) Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertility and Sterility*, 47(3):460-5.
7. Johannisson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. (2000) Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. *Human Reproduction Update*, 6(4):404-12.
8. Wolff H (1995). The biological significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*. 63:1143.
9. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A (2001). Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J. Androl*: 22: 573-583.
10. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologica*; 35:271-278.



FertiPro nv, Industriepark Noord 32,  
8730 Beernem, Belgium.  
URL: <https://www.fertipro.com>  
E-mail: [info@fertipro.com](mailto:info@fertipro.com)



LEUCO\_PLUS